

液体培养富锌金针菇锌源与锌添加量的研究

黄仁术, 李耀亭

(皖西学院化学与生命科学系, 安徽六安, 237012)

摘要 对液体培养富锌金针菇的锌源与锌添加量进行了研究, 结果发现: 在 600、700、800、900、1000 mg/kg 的浓度梯度内, 提高 Zn^{2+} 浓度, 会增加菌丝体富锌量。800 mg/kg Zn^{2+} 浓度对菌丝体促长作用极显著 ($P < 0.01$); 900 mg/kg 时, 促长作用有消退现象; 1 000 mg/kg 时, 菌丝体生长受抑显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$)。③在 800 mg/kg Zn^{2+} 浓度时, $Zn(CH_3COO)_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $ZnCl_2$ 、 $Zn(NO_3)_2$ 之间对菌丝体生物量的影响差异不显著 ($P > 0.05$), 但菌丝体对 $Zn(CH_3COO)_2$ 的富集能力最好, 富锌量达 42.43 mg/g, 与其他 3 种锌源富锌效果差异极显著 ($P < 0.01$)。

关键词 金针菇, 富锌, 锌源, 添加量, 液体培养

锌作为机体必需微量元素之一, 参与体内 300 余种酶和功能蛋白的组成^[1], 与很多基础性生理活动密切相关, 其中以维持机体正常代谢, 促进身体、智力发育、增强免疫力最为重要^[2]。然而有关数据显示, 我国有 60% 的儿童每天锌摄入量仅为标准量的 50%, 影响了儿童的正常发育; 对老年人的锌营养状况研究也表明, 锌摄入不足, 可致免疫功能的减退, 易患肿瘤和感染性疾病^[3]。机体普遍缺锌, 主要缘于锌的吸收利用受到如植酸、膳食纤维等因素的抑制, 另外, Zn^{2+} 易溶于酸, 而肠道为碱性, 锌易生成不溶性的氢氧化物而不易吸收; 但锌与蛋白质、氨基酸等配体结合后, 不形成不溶性的氢氧化物, 故易吸收^[4]。如莫宝庆等研究发现富锌金针菇的相对生物利用率是 $ZnSO_4$ 的 207% 或 181%^[5]; 另有资料显示, 奶牛日粮中添加 600 mg/kg 的蛋白锌, 产奶量比添加同样剂量的无机锌盐提高 25.4%^[6]。

可见, 利用真菌富集功能, 将无机锌与蛋白、糖等物质结合成有机锌蛋白和锌多糖等大分子活性物质, 既避免了无机锌的缺点, 又更有利于有机锌的免疫功能和食用菌的抗病功能的发挥^[7,8]。基于此, 本试验开展液体培养富锌金针菇锌源与锌添加量的研究, 旨在利用菌丝体这个无限繁殖的载体, 把人及动物所需锌元素同化到细胞中去, 再利用先进的工业技术常年生产菌体, 开发利于机体吸收且无副作用的天然高锌食品或饲料添加剂, 这具有指导实践的意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

第一作者: 硕士, 讲师。

收稿日期: 2007-05-09, 改回日期: 2007-07-20

1.1.1 供试菌种

金针菇菌株 F19。

1.1.2 培养基

斜面培养基(PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 值自然。

平皿培养基(加富 PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 值自然。

液体种子培养基(%): 葡萄糖 4, NH_4NO_3 0.2, VB_1 0.005, KH_2PO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, pH 6.5。

摇瓶培养基^[9]: 葡萄糖 0.1389 mol/L, NH_4NO_3 0.018 7 mol/L, KH_2PO_4 0.007 4 mol/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002 0 mol/L, VB_1 50 mg/L, pH 6.0。

1.1.3 主要仪器设备

SPX-250B-Z 型生化培养箱, 南京实验仪器厂; FA2004N 精密电子分析天平, 上海精密科学仪器有限公司; HQL-150A 型恒温摇床, 中国科学院武汉科学仪器厂; TDL-5-A 型台式离心机, 湖南星科科学仪器有限公司; JP-303 型示波极谱仪, 成都仪器厂。

1.1.4 主要试剂

$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 纯度均大于 99.0%, $ZnCl_2$ 纯度 $\geq 98\%$ 。

1.2 试验方法

1.2.1 液体菌种制备

金针菇母种于 PDA 试管斜面培养后, 接种到装有 PDA 加富培养基的平皿中, 25℃ 恒温培养箱中扩大培养至长满平皿; 再用无菌打孔器取 1 块约 0.5~1.0 cm² 的菌种块, 接入盛有 100 mL 液体种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 25℃ 静置培养 2 d 后, 120 r/

min 振荡培养 3 d, 得液体活化菌种。

1.2.2 摇瓶培养

取 100 mL 摇瓶培养基装 250 mL 三角瓶后, 分别以 $Zn(CH_3COO)_2$ 、 $Zn(NO_3)_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $ZnCl_2$ 作为锌源, 按 0、600、700、800、900、1 000 mg/kg 的 Zn^{2+} 浓度, 向各组摇瓶添加锌源, 每组 3 个重复。摇瓶起始 pH 6.0, 置高压蒸汽灭菌锅内于 121℃ 下灭菌 30 min, 冷却后无菌操作接种, 每个发酵瓶接种量 10% (V/V), 摇床转速 150 r/min, 23℃ 发酵 8 d^[9]。

1.2.3 菌丝体(干重)生物量的测定

将每瓶发酵液用蒸馏水洗至水相澄清, 5 000 r/

min 离心 20 min 后菌丝体置于干燥箱 60℃ 下干燥至恒重, 在精密电子分析天平上精确称重。

1.2.4 菌丝体(干重)富锌量的测定

取炭化并灰化的菌丝体, 用 JP-303 型示波极谱仪测定富锌量。锌标准液的线性回归方程为 $I_y = 6.987 \times 10^2 X + 3.108 \times 10^3$ (X 为锌浓度), 相关系数为 $r = 0.9994$ 。

2 结果与分析

2.1 锌源及 Zn^{2+} 浓度对菌丝体生物量与富锌量的影响

表 1 不同锌源及 Zn^{2+} 浓度对菌丝体平均生物量与富锌量的影响

测定指标	0mg/kg	600mg/kg	700mg/kg	800mg/kg	900mg/kg	1 000mg/kg	
$Zn(CH_3COO)_2$	生物量/g · L ⁻¹	12.37	13.40	14.13	14.58	12.61	11.07
	富锌量/mg · g ⁻¹	1.74	33.65	38.61	42.43	49.57	55.53
	锌总量/mg · L ⁻¹	21.52	450.91	545.56	618.63	625.08	614.72
$Zn(NO_3)_2$	生物量/g · L ⁻¹	12.37	13.14	13.86	14.13	13.24	11.37
	富锌量/mg · g ⁻¹	1.74	29.55	34.01	40.16	41.45	51.46
	锌总量/mg · L ⁻¹	21.52	388.29	471.38	567.46	548.80	585.10
$ZnSO_4$	生物量/g · L ⁻¹	12.37	13.23	14.15	14.18	13.81	11.32
	富锌量/mg · g ⁻¹	1.74	31.57	34.45	37.61	41.22	55.33
	锌总量/mg · L ⁻¹	21.52	417.67	487.47	533.31	569.25	626.34
$ZnCl_2$	生物量/g · L ⁻¹	12.37	13.11	14.10	14.14	13.57	10.85
	富锌量/mg · g ⁻¹	1.74	28.37	33.58	37.32	40.01	52.02
	锌总量/mg · L ⁻¹	21.52	371.93	473.48	527.71	542.94	564.42

由表 1 可知, 不管选用哪一种锌源, 随着 Zn^{2+} 浓度的增加, 菌丝体富锌量也随着上升; 但 Zn^{2+} 增加到一定浓度后, 菌丝体生长受到抑制, 食用价值降低, 并且菌丝体的含锌总量也变得不稳定。因此, 在金针菇

富集高锌的前提下, 应以菌丝体生物量为主要判断依据, 要求高锌菌株在液体培养中尽可能不影响菌丝体生长。

2.2 $Zn(CH_3COO)_2$ 添加量筛选

表 2 不同 $Zn(CH_3COO)_2$ 浓度对金针菇菌丝体生物量的影响

浓度/mg · kg ⁻¹	平均生物量 $X_i/g \cdot L^{-1}$	$X_i - 11.07$	$X_i - 12.37$	$X_i - 12.61$	$X_i - 13.40$	$X_i - 14.13$
800	14.58	3.51 **	2.21 **	1.97 **	1.18 **	0.45 **
700	14.13	3.06 **	1.76 **	1.52 **	0.73 **	
600	13.40	2.33 **	1.03 **	0.79 **		
900	12.61	1.54 **	0.24 ^N			
0	12.37	1.30 **				
1 000	11.07					

注: $df_A = 5, df_e = 12; SS_A = 24.56, SS_e = 0.91; S_x = 0.159; N$ 表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

进一步对表 1 数据进行分析, 用新复极差法 (SSR 法) 检验不同 Zn^{2+} 浓度对菌丝体生物量的影响, 以确定 $Zn(CH_3COO)_2$ 的最佳添加量。结果由表 2 可知, 600、700、800mg/kg 的 Zn^{2+} 浓度 ($Zn(CH_3COO)_2$) 与空白对照组间差异极显著 ($P < 0.01$), 且随着添加量的增加, 菌丝体干重也极显著性 ($P < 0.01$) 增加。但 Zn^{2+} 浓度添加到 900 mg/kg 时, 与对照组相比, 其促生长作用不再显现 ($P > 0.05$), 尤其添加到 1 000 mg/kg 时, 菌丝体生长受抑

极显著 ($P < 0.01$)。从而确定以 $Zn(CH_3COO)_2$ 作锌源, Zn^{2+} 的最佳添加浓度为 800 mg/kg。

2.3 $Zn(NO_3)_2$ 添加量筛选

同理由表 3 可知, 700、800 mg/kg 的 Zn^{2+} 浓度与空白对照组间差异极显著 ($P < 0.01$)。但 600 mg/kg Zn^{2+} 浓度对菌丝体的促长作用不显著 ($P > 0.05$), 而 900 mg/kg 对菌丝体的促长作用也不再显现 ($P > 0.05$), 尤其添加到 1 000 mg/kg 时, 菌丝体生长受抑显著 ($P < 0.05$)。从而确定以 $Zn(NO_3)_2$

作锌源, Zn^{2+} 的最佳添加浓度为 800 mg/kg。

表 3 不同 $Zn(NO_3)_2$ 浓度对金针菇菌丝体生物量的影响

浓度/mg · kg ⁻¹	平均生物量 $X_i/g \cdot L^{-1}$	$X_i-11.37$	$X_i-12.37$	$X_i-13.14$	$X_i-13.24$	$X_i-13.86$
800	14.13	2.76**	1.76**	0.99 ^N	0.89 ^N	0.27 ^N
700	13.86	2.49**	1.49**	0.72 ^N	0.62 ^N	
900	13.24	1.87**	0.87 ^N	0.10 ^N		
600	13.14	1.77**	0.77 ^N			
0	12.37	1.00*				
1 000	11.37					

注: $df_A=5, df_e=12, SS_A=15.47, SS_e=3.25, S_x=0.301$; N 表示差异不显著 ($P>0.05$)。

2.4 $ZnSO_4$ 添加量筛选

同理由表 4 可知, 600、700、800 mg/kg 的 Zn^{2+} 浓度与空白对照组间差异显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$), 且以 800 mg/kg 的添加量效果最佳。到

900 mg/kg 后, 添加效果有所降低, 尤其到 1 000 mg/kg 后, 菌丝体的生长反而极显著性受抑 ($P<0.01$)。从而确定以 $ZnSO_4$ 作锌源, Zn^{2+} 的最佳添加浓度为 800 mg/kg。

表 4 不同 $ZnSO_4$ 浓度对金针菇菌丝体生物量的影响

浓度/mg · kg ⁻¹	平均生物量 $X_i/g \cdot L^{-1}$	$X_i-11.32$	$X_i-12.37$	$X_i-13.23$	$X_i-13.81$	$X_i-14.15$
800	14.18	2.86**	1.81**	0.95*	0.37 ^N	0.03 ^N
700	14.15	2.83**	1.78**	0.92*	0.34 ^N	
900	13.81	2.49**	1.44**	0.58 ^N		
600	13.23	1.91**	0.86*			
0	12.37	1.05**				
1 000	11.32					

注: $df_A=5, df_e=12, SS_A=19.30, SS_e=1.98, S_x=0.234$; N 表示差异不显著 ($P>0.05$)。

2.5 $ZnCl_2$ 添加量筛选

同理由表 5 可知, 600、700、800 mg/kg 的 Zn^{2+} 浓度与空白对照组间差异显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$), 且以 800 mg/kg 的添加量效果最佳。到

900 mg/kg 后, 添加效果有所降低, 尤其到 1 000 mg/kg 后, 菌丝体的生长反而极显著性受抑 ($P<0.01$)。从而确定以 $ZnCl_2$ 作锌源, Zn^{2+} 的最佳添加浓度为 800 mg/kg。

表 5 不同 $ZnCl_2$ 浓度对金针菇菌丝体生物量的影响

浓度/mg · kg ⁻¹	平均生物量 $X_i/g \cdot L^{-1}$	$X_i-10.85$	$X_i-12.37$	$X_i-13.11$	$X_i-13.57$	$X_i-14.10$
800	14.14	3.29**	1.77**	1.03*	0.57 ^N	0.04 ^N
700	14.10	3.25**	1.73**	0.99*	0.53 ^N	
900	13.57	2.72**	1.20**	0.46 ^N		
600	13.11	2.26**	0.74*			
0	12.37	1.52**				
1 000	10.85					

注: $df_A=5, df_e=12, SS_A=23.64, SS_e=1.89, S_x=0.229$; N 表示差异不显著 ($P>0.05$)。

2.6 锌源筛选

表 6 不同锌源在 Zn^{2+} 浓度 800 mg/kg 时对菌丝体生物量的影响分析

变因	平方和(SS)	自由度(df)	均方(MS)	F
碳源间(A)	0.42	3	0.14	2.8 ^N
误差(e)	0.41	8	0.05	
总变异(T)	0.83	11		

4 种锌源分别以 800 mg/kg 的浓度添加, 其对菌丝体的促长效果依次为 $Zn(CH_3COO)_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $ZnCl_2$ 、 $Zn(NO_3)_2$ 。但实际上经表 6 的 F 检验, 其对菌丝体生物量的影响差异不显著 ($P>0.05$)。因此,

在锌源的选择上, 要考虑菌丝体富锌量这一指标。

表 7 不同锌源在 Zn^{2+} 浓度 800 mg/kg 时对菌丝体富锌量的影响

锌源	平均富锌量 $X_i/mg \cdot g^{-1}$		
	$X_i-37.32$	$X_i-37.61$	$X_i-40.16$
$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$	42.43	5.11**	4.82** 2.27**
$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	40.16	2.84**	2.55**
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	37.61	0.29 ^N	
$ZnCl_2$	37.32		

注: $df_A=3, df_e=8, SS_A=51.9999, SS_e=0.6466, S_x=0.1641$; N 表示差异不显著 ($P>0.05$)。

由表 7 可知, 在 Zn^{2+} 浓度 800 mg/kg 时,

Zn(CH₃COO)₂的富锌效果最佳,且与其他3种锌源的富锌效果差异极显著($P < 0.01$);其次为Zn(NO₃)₂,富锌效果也与另2种锌源差异极显著($P < 0.01$);而ZnSO₄与ZnCl₂间的富锌效果差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

900 mg/kg 以内的 Zn²⁺ 浓度会促进菌丝体生长,尤其以 800 mg/kg 的 Zn²⁺ 浓度促长作用最为显著。这主要缘于锌与酶的关系极为密切,它决定并影响着 160 多种酶的活性,尤其对金属酶具有催化性、结构性和调节性功能。这些酶类主要包括氧化还原酶(超氧化物歧化酶)、转移酶(RNA 聚合酶)、水解酶(碱性磷酸酶)、裂解酶(碳酸酐酶)及连接酶(tRNA 合成酶)。锌还是许多功能蛋白如金属硫蛋白、核蛋白、受体等的组成成分^[1],可直接参与核酸及蛋白质合成,对细胞的分裂生长及再生作用重大。孙希雯等通过电镜观察富锌金针菇也发现,从第 2 天开始,加锌的比不加锌的胞内大颗粒合成物质增多;第 4 天不加锌细胞内念珠状类核糖体和贮藏颗粒均多,这是发酵的旺盛期的表现;到了第 6 天,不加锌的胞内营养物质已被分解利用,内含物明显增多,而加锌的类核糖体和贮藏颗粒都很多,看出发酵仍很旺盛^[7]。另外,1 000 mg/kg 的 Zn²⁺ 浓度虽然能提高菌丝体的富锌量,但对菌丝体生长有抑制作用。这可能与锌浓度过高,形成菌丝体表面吸附,从而阻碍菌丝对培养基营养的吸收有关。

在加锌量相同的情况下,金针菇对不同锌源的富

集能力不同,其中以 Zn(CH₃COO)₂ 最好,Zn(NO₃)₂、ZnSO₄与ZnCl₂次之。这是因为Zn(CH₃COO)₂实质上是有机锌,生物利用度为 14%,而Zn(NO₃)₂、ZnSO₄、ZnCl₂等无机锌生物利用度仅 6%~7%^[10]。作为有机锌的弱酸弱碱盐,Zn(CH₃COO)₂能使菌丝与锌在适宜的、稳定的环境中络合和生长,Zn 的配位数是 4,其空轨可与蛋白质链上的 NH₄⁺、COO⁻ 配位形成结构牢固的螯合物,提高 Zn 的有机化程度。而 Zn²⁺ 浓度 800 mg/kg 的 Zn(NO₃)₂ 稍优于 ZnSO₄ 与 ZnCl₂,可能是在补充高剂量 Zn(NO₃)₂ 的同时,也补充了硝态氮,从而对培养基有活化作用。

参 考 文 献

- 1 Vallee B L, Falchuk K H. The biochemical basis of zinc physiology[J]. *Physiol Rev*, 1993, 73: 79-118.
- 2 王夔主编. 生命科学中的微量元素[M]. 北京: 中国计量出版社, 1992
- 3 魏 华, 谢俊杰, 戴明辉, 等. 金针菇富锌研究[J]. *中国食用菌*, 1993, 12(2): 8-10
- 4 Mertz W. The essential trace element[J]. *Science*, 1981, 213(4514): 1 332~1 338
- 5 莫宝庆, 马凤楼. 富锌金针菇中锌生物利用的研究[J]. *营养学报*, 1990, 12(4): 378~381
- 6 李淑敏, 史秀云, 丁宏标, 等. 富铁锌真菌作为饲料添加剂的研究[J]. *中国畜牧杂志*, 1997, 33(3): 9~11
- 7 Mertz W. The essential trace elements [J]. *Science*, 1981, 213(4 514): 1 332~1 338
- 8 邓百万, 陈文强. 猪苓菌丝液体培养及富锌研究[J]. *中国食用菌*, 2003, 22(1): 33~34
- 9 黄仁术. 金针菇液体培养营养需求及培养条件研究[J]. *食品工业科技*, 2006, (12): 89~91, 94
- 10 李天真. 大米营养元素锌强化的研究[J]. *粮食科技与经济*, 2003, (4): 41~42

An Approach to the Zinc Resource and Zinc Dosage for Submerged Culturing Enriched *Flammulina velutipes*

Huang Renshu, Li Yaoting

(Department of Chemistry and Life Science West Anhui University, Lu'an 237012, China)

ABSTRACT This experiment studied the zinc resource and zinc dosage for submerged culturing enriched *Flammulina velutipes*. The results are as follows: ① Within the five Zn²⁺ concentration gradients of 600, 700, 800, 900 and 1 000 mg/kg, the increase of the Zn²⁺ concentration leads to the zinc increase of mycelium biomass. ② The Zn²⁺ concentration of 800 mg/kg significantly promoted mycelium biomass ($P < 0.01$); the high zinc did not enhance the growth of mycelium biomass at concentration of 900 mg/kg and 1 000 mg/kg where restricting power remained significant ($P < 0.05$) or extremely significant ($P < 0.01$) on mycelium biomass. ③ At Zn²⁺ concentration level of 800 mg/kg, no significant difference on mycelial biomass among ethylic acid zinc, zinc sulfate, zinc chloride and zinc nitrate ($P > 0.05$) was observed; while *Flammulina velutipes* has the best ability in enriching ethylic acid zinc, the zinc accumulation of *Flammulina velutipes* mycelium is 42.43 mg/g ($P < 0.01$).

Key words *Flammulina velutipes*, zinc enrichment, zinc resource, dosage, submerged culture